

08/381286

Europäisches
PatentamtEuropean
Patent OfficeOffice européen
des brevets**PRIORITY DOCUMENT**

REC'D 15 MAY 1998

WIPO PCT

Bescheinigung

Certificate

Attestation

Die angehefteten Unterlagen stimmen mit der ursprünglich eingereichten Fassung der auf dem nächsten Blatt bezeichneten europäischen Patentanmeldung überein.

The attached documents are exact copies of the European patent application described on the following page, as originally filed.

Les documents fixés à cette attestation sont conformes à la version initialement déposée de la demande de brevet européen spécifiée à la page suivante.

Patentanmeldung Nr. Patent application No. Demande de brevet n°

97104877.2

Der Präsident des Europäischen Patentamts:
Im Auftrag

For the President of the European Patent Office

Le Président de l'Office européen des brevets
p.o.


M. B. RIJLING

DEN HARTOG, D.
THE HAGUE, 31/03/98
LA HAYE



Europäisches
Patentamt

European
Patent Office

Office européen
des brevets

Blatt 2 der Bescheinigung
Sheet 2 of the certificate
Page 2 de l'attestation

Anmeldung Nr.:
Application no.: 97104877.2
Demande n°:

Anmeldetag:
Date of filing: 21/03/97
Date de dépôt:

Anmelder:
Applicant(s):
Demandeur(s):
BOEHRINGER MANNHEIM GMBH
68305 Mannheim
GERMANY

Bezeichnung der Erfindung:
Title of the invention:
Titre de l'invention:
Verfahren zur Reinigung und Kristallisierung von Proteasomen

In Anspruch genommene Priorität(en) / Priority(ies) claimed / Priorité(s) revendiquée(s)

Staat
State
Pays

Tag:
Date:
Date:

Aktenzeichen:
File no.
Numéro de dépôt:

Internationale Patentklassifikation:
International Patent classification:
Classification internationale des brevets:
C12N9/60

Am Anmeldetag benannte Vertragsstaaten:
Contracting states designated at date of filing: AT/BE/CH/DE/DK/ES/FI/FR/GB/GR/IE/IT/LI/LU/MC/NL/PT/SE
Etats contractants désignés lors du dépôt:

Bemerkungen:
Remarks: Die ursprüngliche Bezeichnung dieser Anmeldung lautet:
Remarques: Proteasomenstruktur und Verfahren zur Identifizierung von Proteasom-Inhibitoren

PATENTANWÄLTE

DIPL.-ING. H. WEICKMANN
DIPL.-ING. F. A. WEICKMANN
DIPL.-CHEM. B. HUBER
DR.-ING. H. LISK
DIPL.-PHYS. DR. J. PRECHTEL
DIPL.-CHEM. DR. B. BÖHM
DIPL.-CHEM. DR. W. WEISS
DIPL.-PHYS. DR. J. TIESMEYER
DIPL.-PHYS. DR. M. HERZOG

POSTFACH 860 820
81635 MÜNCHEN

KOPERNIKUSSTRASSE 9
81679 MÜNCHEN

TELEFON (089) 4 55 63-0

TELEX 5 22 621

TELEFAX (089) 4 70 50 68

eMail weickmann@compuserve.com

21. März 1997

Unser Zeichen:
15404P EP/WWvo

Anmelder:
Boehringer Mannheim GmbH
Sandhofer Strasse 112-132

68305 Mannheim-Waldhof

Proteasomenstruktur und Verfahren zur Identifizierung von
Proteasom-Inhibitoren

Proteasomenstruktur und Verfahren zur Identifizierung von Proteasom-Inhibitoren

Beschreibung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum Gewinnen einer aufgereinigten eukaryontischen kristallisierbaren Proteasomen-Präparation und die durch das Verfahren erhältliche Proteasomen-
10 Präparation. Weiterhin betrifft die Erfindung eine aufgereinigte eukaryontischen Proteasomen-Präparation in kristallisierter Form. Mit Hilfe der Kristalldaten aus dieser Proteasomen-Präparation können neue Proteasomen-Inhibitoren, insbesondere mit Hilfe von computergestützten Modelling-Programmen
15 identifiziert und gewonnen werden.

Das Proteasom ist das zentrale Enzym beim Proteinabbau sowohl im Cytosol als auch im Zellkern. Es ist an vielen biologischen Prozessen beteiligt, einschließlich der Entfernung abnormaler,
20 fehlgefalteter oder falsch assemblierter Proteine, der Reaktion auf Stress (durch Prozessierung oder Abbau von Transkriptionsregulatoren), der Zellzykluskontrolle (durch Abbau von Zyklinen), der Zelldifferenzierung und metabolischen Adaption (durch Zerstörung von Transkriptionsfaktoren oder metaboli-
25 schen Enzymen) und der zellulären Immunreaktion (durch Erzeugung antigener Peptide, die von MHC Klasse I Molekülen präsentiert werden). Für diese zellulären Funktionen, die auf einem Ubiquitin und ATP erfordernden Abbau von Proteinen beruhen, wird das 26S Proteasom benötigt, dessen Kern und proteo-
30 lytische Kammer durch das 20S Proteasom gebildet werden.

Das 20S Proteasom aus dem Archaeobakterium *Thermoplasma acidophilum* wurde durch Röntgenstrukturkristallographie bei einer Auflösung von 0,34 nm analysiert. Es hat eine zylindrische
35 Form mit einer Länge von 14,8 nm und einem maximalen bzw. minimalen Durchmesser von 11,3 nm bzw. 7,5 nm. Es besteht aus 28 Untereinheiten, die in einem Partikel als 4 homoheptamere

Ringe $\alpha 7 \beta 7 \beta 7 \alpha 7$ mit D7 Symmetrie angeordnet sind (Löwe et al., (1995), Science 268, 533-539). Im T.acidophilum Proteasom ist der N-terminale Threoninrest der β -Untereinheiten die Bindestelle von inhibitorischen Peptidaldehyden und essentiell für die hydrolytische Aktivität.

Eukaryontische Proteasomen sind erheblich komplexer als das archaebakterielle Proteasom. So ist das 20S Proteasom aus *Saccharomyces cerevisiae* aus insgesamt sieben verschiedenen α -Typ und sieben verschiedenen β -Typ-Untereinheiten aufgebaut, die bereits kloniert und sequenziert wurden, vgl. z. B. Heinemeyer et al. (1994), Biochemistry 33, 12229-12237).

Die eukaryontischen 20S Proteasomen, z. B. aus Hefe und aus Säugern, sind hinsichtlich der Aminosäuresequenzen von Untereinheiten und ihrer durch Elektronenmikroskopie erkennbaren Grobstruktur sehr nahe verwandt. Die α -Typ und β -Typ Untereinheiten des Säuger 20S Proteasoms bilden eine geordnete und wohldefinierte Struktur (Kopp et al. (1995), J. Mol. Biol. 248, 264-272). In Säugerzellen können drei zusätzliche nicht essentielle Untereinheiten des 20S Proteasoms, die als LMP2, LMP7 und MECL1 bezeichnet werden, konstitutive Komponenten, nach Induktion mit dem Cytokin Interferon γ ersetzen. Ihre Expression oder gezielte Deletion ändert die Peptidasespezifität des Proteasoms und die Expressionsstärke von MHC Klasse I Molekülen an der Zelloberfläche.

In der Veröffentlichung Rivett et al. (1994), Methods Enzymol. 244, 331-350) und den darin enthaltenen Zitaten sind bisher zur Aufreinigung von Proteasomen verwendete Ausgangsmaterialien, z. B. Gewebe und Zellen von Säugern, wie Maus, Ratte, Mensch oder Rind, anderen Tieren, Pflanzen und Hefe aufgelistet.

Auch in der Patentliteratur finden sich zahlreiche Dokumente, die Proteasomen betreffen. So wird beispielsweise die Herstellung von eukaryontischen Proteasomen in EP-A-03 45 750, JP-A-

05 292 964 und JP-A-06 022 759 beschrieben. Die dort offenbarten Proteasomen-Präparationen besitzen jedoch keine ausreichende Reinheit, um eine Kristallisierung zu ermöglichen.

5 Nukleotid- und Aminosäuresequenzen von Proteasomenuntereinheiten werden beispielsweise in den japanischen Anmeldungen JP-A-04 077 497, JP-A-04 077 498, JP-A-04 117 283, JP-A-05 317 059, JP-A-07 255 476, JP-A-08 116 972, JP-A-08 205 871 und JP-A-08 217 796 sowie im japanischen Patent 40 51 896 beschrieben.
10 ben.

Inhibitoren für das Proteasom sind beispielsweise in JP-A-05 000 968, WO 92/20 804, WO 94/17 816, WO 95/24 914, WO 95/25 533, WO 96/13 266, WO 96/32 105 (Lactacystinanaloga) und US-A-
15 55 80 854 (Peptidaldehydinhhibitoren) beschrieben.

Somit wird ersichtlich, daß ein großes Bedürfnis nach weiteren Erkenntnissen über Proteasomen, insbesondere hinsichtlich deren genauen Struktur besteht, um die Herstellung von neuen
20 Proteasomeninhibitoren auf rationale Weise zu ermöglichen. Die der Erfindung zugrundeliegende Aufgabe bestand somit darin, ein Verfahren bereitzustellen, das die Kristallisierung eukaryontischer Proteasomenpräparationen ermöglicht, so daß mit Hilfe der Kristallstruktur die Entwicklung neuer Inhibitoren
25 vereinfacht wird.

Die erfindungsgemäße Aufgabe wird gelöst durch ein Verfahren zum Gewinnen einer aufgereinigten eukaryontischen Proteasomenpräparation, umfassend die Schritte:

- 30 (a) Herstellung eines Rohextrakts durch Aufschluß von eukaryontischen Zellen,
- (b) Abtrennung unlöslicher Bestandteile aus dem Rohextrakt,
- (c) chromatographische Auftrennung in Fraktionen über
35 ein Ionenaustauschermedium, z. B. Q- Sepharose,
- (d) Testen der in Schritt (c) erhaltenen Fraktionen und Sammeln der aktiven Fraktionen,

- (e) chromatographische Auftrennung über Hydroxyapatit,
- (f) Testen der in Schritt (e) erhaltenen Fraktionen und Sammeln der aktiven Fraktionen,
- (g) Konzentrierung der vereinigten Fraktionen,
- 5 (h) chromatographische Auftrennung über ein Gelfiltrationsmedium in einem Molekulargewichtsbereich von 5 kD bis 5 MD, z. B. Superose und
- (i) Testen der in Schritt (h) erhaltenen Fraktionen und Sammeln der aktiven Fraktionen.

10

Als Ausgangsmaterial für das erfindungsgemäße Verfahren können beliebige eukaryontische Zellen eingesetzt werden, z. B. Tierzellen, Pflanzenzellen oder Pilzzellen wie etwa Hefezellen. Besonders bevorzugt ist die Verwendung von Hefezellen, z. B.

15 *Saccharomyces cerevisiae*.

Das Testen der Fraktionen während des Anreicherungsprozesses erfolgt üblicherweise durch Bestimmung der für Proteasomen typischen proteolytischen Aktivität. Als Substrate können

20 hierbei beispielsweise bekannte chromogene Peptide eingesetzt werden. Vorzugsweise erfolgt das Testen der Fraktionen derart, daß man jeweils zwei parallele Bestimmungen der proteolytischen Aktivität durchführt, wobei die eine in Abwesenheit und die andere in Gegenwart eines Proteasomeninhibitors, z. B.

25 Lactacystin, durchgeführt wird. Diese Art des Testens erlaubt eine eindeutige Unterscheidung der Proteasomen enthaltenden Fraktionen von anderen Fraktionen mit proteolytischer Aktivität.

30 Die Durchführung der Anreicherung umfaßt drei chromatographische Trennschritte (c), (e) und (h), von denen mindestens einer in einem FPLC-System durchgeführt werden kann, z. B. Schritt (h).

35 Durch das erfindungsgemäße Verfahren wird eine aufgereinigte Proteasomen-Präparation erhalten, die in einer ausreichenden

Menge und Reinheit vorliegt, so daß eine nachfolgende Kristallisierung ermöglicht wird.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist somit
5 eine aufgereinigte eukaryontische Proteasomenpräparation, die durch das erfindungsgemäße Verfahren erhältlich ist. Noch ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist eine aufgereinigte eukaryontische Proteasomen-Präparation in kristallisierbarer Form. Noch ein weiterer Gegenstand der vorliegenden
10 Erfindung ist eine aufgereinigte kristallisierte eukaryontische Proteasomen-Präparation.

Die kristallisierte Proteasomen-Präparation kann auch einen Proteasomen-Inhibitor enthalten. Beispiele für geeignete be-
15 kannt Proteasomen-Inhibitoren sind Lactacystin oder Analoga davon bzw. Tripeptid-Aldehyde wie Calpaininhibitor.

Die erfindungsgemäße eukaryontische Proteasomen-Präparation umfaßt ein 20S Proteasom, d. h. einen Komplex aus 28 Unterein-
20 heiten, der jeweils 2 Moleküle von sieben verschiedenen α -Typ-Untereinheiten und sieben verschiedenen β -Typ-Untereinheiten enthält. Darüber hinaus kann der Komplex noch Metallionen, z. B. Magnesium, Lösungsmittelmoleküle, z. B. Wasser, und andere Polypeptidkomponenten enthalten.

25 Die erfindungsgemäße aufgereinigte eukaryontische Proteasomenpräparation kann zur Identifizierung und Gewinnung neuer Proteasomen-Inhibitoren eingesetzt werden. Dabei werden insbesondere Daten aus der Kristallstruktur von kristallisierten eukaryontischen Proteasomen-Präparationen eingesetzt. Die Identifizierung und Gewinnung neuer Proteasomen-Inhibitoren erfolgt
30 vorzugsweise in einem computergestützten Modellprogramm.

Beispielsweise kann das Inhibitor-Design durch visuelle Inspek-
35 tion graphischer Darstellungen der Struktur erfolgen und zwar insbesondere

- (a) durch Bestimmung der für Liganden zugänglichen Volumina an aktiven Stellen, z. b. mit Hilfe der Programme INSIGHT, SYBYL, QUANTA, FRODO, O etc.,
- 5 (b) durch Bestimmung von idealen Ligandeneigenschaften hinsichtlich Hydrophobizität oder Wasserstoffbrückenbindungen, z. B. mit Hilfe der Programme LUDI, GRID etc. oder/und
- 10 (c) durch Bestimmung der elektronischen Eigenschaften von für Liganden zugänglichen Oberflächen an den aktiven Stellen, z. B. mit Hilfe des Programms GRASP etc.

Alternativ oder zusätzlich können Liganden durch automati-
15 sierte Ligandenfragment-Andock- oder Anpassprozeduren, z. B. mit Hilfe der Programme DOCK, LUDI, LEAPFROG etc. ermittelt werden.

Besonders bevorzugt werden für diesen Zweck die Kristalldaten
20 der Proteasomuntereinheiten vom β -Typ, insbesondere der Proteasom-Untereinheiten $\beta 5$ /PRE2, $\beta 1$ /PRE3 oder/und $\beta 2$ /PUP1 bzw. homologer Untereinheiten aus anderen eukaryontischen Proteasomen sowie benachbarte Untereinheiten davon, z. B. $\beta 4$ /C11 oder/und $\beta 7$ /PRE4 verwendet.

25 Für das Design von Inhibitoren des humanen Proteasoms können die erfindungsgemäßen Kristallstrukturdaten des Hefeproteasoms mit bekannten Aminosäuresequenzen des humanen Proteasoms durch Homologiemodelling modifiziert werden. Ein solches Homologie-
30 modelling kann durch molekulare Grafikprogramme wie etwa O, INSIGHT, FRODO, etc. durchgeführt werden. Insbesondere erfaßt die vorliegende Erfindung ein Homologiemodelling der homologen aktiven Stellen der aktiven Monomere im allgemeinen und insbesondere zum Zwecke des Inhibitordesigns. In Figur 1 ist die
35 Homologie der Aminosäuresequenzen des Hefeproteasoms und des humanen Proteasoms in den relevanten Bereichen gezeigt.

Weiterhin soll die Erfindung durch nachfolgenden Beispiele und Figuren erläutert werden. Es zeigen:

- Figur 1 die Homologie zwischen den für die aktiven Untereinheiten des Proteasoms kodierenden Aminosäuresequenzen aus Hefe und Mensch; die $\beta 1/\text{PRE}3$, $\beta 2/\text{PUP}1$, $\beta 5/\text{PRE}2$ Subfamilien sind gelb, grün bzw. blau dargestellt; die Reste der S1-Tasche, welche die Spezifitätsänderungen der PRE3 Subfamilie nach Substitution der humanen Untereinheit Y durch LMP2 nach Cytokininduktion beeinflussen, sind braun gezeichnet;
- Figur 2 die Topologie der 28 Untereinheiten des 20S Proteasoms, gezeichnet als Kugeln,
- Figur 3 die C α -Kettenpositionen der Untereinheiten $\beta 7/\text{PRE}4$, $\beta 6/\text{C}5$, $\beta 1'/\text{PRE}3$, $\beta 2'/\text{PUP}1$ und $\beta 3'/\text{PUP}3$, in denen die β -cis und β -trans- β -Wechselwirkungen durch Kontakte von Insertionssegmenten hervorgehoben sind,
- Figur 4a bis b Elektronendichtekarten (Konturiert ab 1 σ) in ähnlichen Orientierungen um THR1 mit zwei F $_o$ -F $_c$ -Coeffizienten nach zweifacher Mittlung; die roten Modellteile wurden über die Phasengebung weggelassen. $\beta 5/\text{PRE}2$ mit dem kovalent gebundenem Lactacystin (LACT) und dem Wassermolekül NUK (a) und $\beta 7/\text{Pre}4$ mit einem Teil eines Propeptids (b),
- Figur 5 ein Schema der vorgeschlagenen chemischen Schritte von Autolyse und Substrathydrolyse. Erzeugung eines Prozessierungsintermediats durch Hydrolyse an der "sauren" β -Ringfläche (A). Erzeugung der vollständig prozessierten aktiven Untereinheit über ein Acyl-Enzym (B)

und dessen Hydrolyse (C). Michaelis-Komplex eines Substratpolypeptids (D). Spaltung an der β -Ringfläche und Bildung mit Peptidspaltung assoziierten Acyl-Enzyms (E). Acyl-Enzym-Hydrolyse und Freisetzung des Octapeptidprodukts (F).

Figur 6a bis c die Bindung des Calpaininhibitors und die S1 Taschen, $\beta 1$ /PRE3 ist in Grau mit den P1 kontaktierenden Resten in Rot dargestellt; $\beta 2$ /PUP1 ist in Grün und der Inhibitor in Blau (a) dargestellt; $\beta 2$ /PUP1 (b), $\beta 5$ /PRE2 (c) mit analogen Farbgebungen;

Figur 7 die untere Hälfte der β - β -Kammer. Die Hauptkette mit roten Kreisen für die Carbonylsauerstoffe ist für die C-terminalen Abschnitte der Helices H2 der sieben β -Typ Untereinheiten, die die β -Ringfläche definieren, angegeben. Die intermediär prozessierten und die unprozessierten Propeptide der Untereinheiten $\beta 6$ /C5, $\beta 7$ /PRE4, $\beta 3$ /PUP1 und $\beta 4$ /C11 (grün) und der Calpaininhibitor (gelb) gebunden an $\beta 1$ /PRE3, $\beta 2$ /PUP1 und $\beta 5$ /PRE2 sind gezeigt. Zwei Magnesiumionen, die nahe der β -Ringfläche lokalisiert sind, sind als silberne Kreise gezeichnet; und

Figur 8 eine Oberflächenansicht des Proteasomenmoleküls, geschnitten längs der Zylinderachse. Drei der sechs Calpaininhibitormoleküle, gebunden an $\beta 1$ /PRE3, $\beta 2$ /PUP1 und $\beta 5$ /PRE2 sind als raumfüllende Modelle in rot dargestellt. Die abgedichteten α -Öffnungen an beiden Enden des Partikels, einige wenige schmale Seitenfenster und die scharf abgeschnittenen inneren β -Ringflächen sind zu erkennen.

Beispiele

Beispiel 1 Proteinpräparation und Charakterisierung

5 Hefezellen von *Saccharomyces cerevisiae* (Hefe-Mayr, München, Deutschland) wurden zweimal mit eiskaltem Wasser gewaschen und in Puffer A (20 mM Tris-HCl, pH 7,5, 1 mM EDTA, 1 mM NaN_3) in einem Gewichtsverhältnis Zellen zu Puffer von 2:3 suspendiert. Die Zellen wurden für 10 Min in einer Mühle (Biomatik,
10 Deutschland) mit Glaskugeln (Durchmesser: 0,5 mm; Volumenverhältnis Glaskugeln zu Zellsuspension: 3:2) desintegriert. Das Aufbrechen der Zellen wurde mikroskopisch überwacht.

Nach Filtration wurde der Rohextrakt für 10 min bei 10.000 x g
15 in einer Sorvall RC 2B Zentrifuge abzentrifugiert. Der Überstand wurde erneut 45 min bei 134.000 x g in einem Ti-55,2 Rotor (Beckmann) zentrifugiert. Die Lipide aus der obersten Schicht wurden sorgfältig entfernt und die verbleibenden gelben Lösungen vereinigt. Die Proteinkonzentrationen waren etwa
20 50 mg/ml.

Unmittelbar nach der Zentrifugation wurde der Extrakt auf eine Q-Sepharosesäule (5 x 20 cm) aufgebracht, die mit 280 mM NaCl in Puffer A äquilibriert war. Die Säule wurde mit 280 mM NaCl
25 in Puffer A gewaschen, die Proteine wurden mit einem Gradienten von 280 bis 800 mM NaCl eluiert. Die Durchflußrate war 120 ml/h und es wurden 12 ml Fraktionen gesammelt. Das Proteasom wurde bei 400 - 450 mM NaCl eluiert. In allen Fraktionen wurden Chymotrypsin-artige (CL), Peptidylglutamyl-Peptid-hy-
30 drolase (PGPH) und Trypsin-artige (TL) enzymatische Aktivitäten gemessen.

Um das 20S Proteasom zu erhalten, wurde von allen aktiven Fraktionen in Gegenwart von Lactacystin erneut die CL-Aktivität
35 gemessen und die Fraktionen mit verringerten Aktivität wurden gesammelt. Die vereinigten Fraktionen wurden dreifach mit Wasser verdünnt und auf eine Hydroxyapatitsäule (3 x

10 cm) aufgetragen, die mit 60 mM Kaliumphosphat, pH 7,5 äquilibriert war. Die Säule wurde mit 60 mM Kaliumphosphat pH 7,5 gewaschen und mit einem Gradienten von 60-300 mM Kaliumphosphat eluiert wird. Die Durchflußrate war 60 ml/h. Es wurden 12 ml Fraktionen gesammelt. Die CL-, PGPH- und TL- Aktivität wurde in allen Fraktionen gemessen und die aktiven Fraktionen wurden vereinigt.

Die vereinigten Fraktionen wurden zwanzigfach durch Ultrafiltration unter Verwendung einer AMICON YM30 Membran konzentriert und das Konzentrat wurde auf eine Superose 6 Säule (1 x 30 cm) äquilibriert mit Puffer A aufgetragen. Die Elution wurde mit einer Durchflußrate von 18 ml/h in Puffer A durchgeführt. Das Proteasom eluierte nach 37 min. Aus 500 g Hefezellen konnten auf diese Weise 50 mg kristallisierbares Protein erhalten werden.

Alle präparativen Schritte mit Ausnahme der FPLC wurden bei 4°C ausgeführt. Die chromogenen Peptidsubstrate wurden in Dimethylsulfoxid bei einer Konzentration von 1 mM gelöst. Die proteolytische Aktivität gegen diese Substrate wurde gemäß Achtstetter et al. (1994), J. Biol. Chem. 259, 13344-13348, bestimmt. Die chromogenen Peptidsubstrate wurden von Bachem (Bubendorf, Schweiz) bezogen. Q-Sepharose und Hydroxyapatit stammten von Sigma und BioRad. Die FPLC Vorrichtung, die MonoQ- und Superose 6 Säule stammten von Pharmacia (Freiburg, Deutschland), alle anderen Chemikalien wurden in der höchst möglichen Reinheit von Merck (Darmstadt, Deutschland) bezogen.

30 Beispiel 2 Kristallisierung

Die Kristalle wurden in Hängetropfen bei 24 °C gezüchtet. Die Proteinkonzentration, die zur Kristallisation verwendet wurde, war 40 mg/ml in 10 mM Tris/HCl (pH 7,5) und 1 mM EDTA. Die Tropfen bestanden aus 4 µl der Proteinlösung und 2 µl einer Reservoirlösung, die 40 mM Magnesiumacetat, 0,1 M Morpholinoethansulfonsäure (pH 6,5) und 12 % 2,4-Methylpentandiol ent-

hielt. Die den Inhibitor Lactacystin enthaltenden Kristalle wurden durch Eintauchen in eine 1 mM Lactacystinlösung für 6 h hergestellt. Die den Inhibitor Acetyl-Leu-Leu-Norleucin (Calpain Inhibitor I, Boehringer Mannheim) enthaltenden Kristalle wurden durch Eintauchen in eine 5 mM Calpainlösung für 6 h hergestellt. Die kristallographischen Daten sind in Tabelle 1 angegeben.

Beispiel 3 Kristallographie

10

Die Kristalle waren sehr gut geordnet und zeigten nur eine leichte Anisotropie. Die Acetyl-Leu-Leu-Norleucin-inhibierten Kristalle hatten eine etwas verringerte Ordnung.

15 Die Anisotropie der Diffraktion wurde unter Verwendung der gefundenen Strukturfaktoramplituden mit solchen korrigiert, wie sie aus einem Modell mit isotropen Temperaturfaktoren unter Verwendung von XPLOR (Bruenger, 1992) berechnet wurden. Die Datensätze wurden bei der BW6-Beamline am DESY Hamburg mit
20 einer Synchrotronstrahlung von $\lambda = 0,11$ nm erhalten. Die Kristalle wurden in einen Gefrierschutzpuffer (30 % MPD, 28 mM Magnesiumacetat, 0,1 M Morpholinoethansulfonsäure, pH 6,9) eingetaucht und in einem Strom von 90 °K kaltem Stickstoffgas gefroren. Die Diffraktionsdaten wurden mit einer 300 mm Mar
25 Forschungs-Imagingplatte in einer Entfernung von 275 mm (LACT) oder 280 mm (CAL) gesammelt. Die Bestimmung von Röntgenintensitäten erfolgte mit dem MOSFLM Computerprogramm Version 5.3 und die Datenreduktion wurde mit CCP4 durchgeführt (Leslie (1992), Acta Cryst. D50, 760-763; Joint CCP4 and ESF-EACMB,
30 Newslett. Protein Crystallogr. (Daresburg Laboratory Warrington UK 26; Collaborative Computational Project Number 4 (1994)).

Eine bei 0,5 nm Auflösung berechnete Rotationsfunktion zeigte zwei mit der Kristallsymmetrie in Beziehung stehende Peaks,
35 die auf das Vorhandensein von lokalen diadischen Molekülachsen bei $\psi \ 86^\circ \ \phi \ 90^\circ$ und $\psi \ 94^\circ \ \phi \ 90^\circ$ hinwiesen. Ihre Korrelationswerte waren die Hälfte des Wertes einer kristallographi-

schen Diade, wie sie für eine fast ideale molekulare zweifache Symmetrie zu erwarten war. Das T.acidophilum Modell wurde für die Patterson Suchkalkulationen unter Verwendung von AMoRe (Navaza (1994), Acta Cryst. A50, 157-163) bei einer Auflösung von 0,35 nm eingesetzt. Diese zeigten, wenn man die D7 Symmetrie des Untersuchungsmodells in Betracht zog, eine einzige Lösung mit einem Korrelationswert von 0,32 und einem R-Faktor von 56 % verglichen mit dem nächsthöchsten Peak von 0,28 und 57 %.

10

Das T.acidophilum Modell wurde auf Polyalanin reduziert mit nur einigen wenigen konservierten Resten, die in der α -Typ Untereinheit verblieben. Dieses Modell ergab einen R-Faktor von 57,7 % und wurde zur Berechnung einer $2F_o - F_c$ Karte bei 0,24 nm mit X-PLOR (Bruenger (1992), X-PLOR Version 3.1. A System for X-Ray Crystallography and NMR) verwendet. Die elektronische Dichte wurde im Realraum mit MAIN (Turk (1992), Dissertation, Technische Universität München) unter Verwendung der lokalen Zweifachachse im gegenwärtigen Modell ($\psi=85,1$, $\phi=90,8$, $\kappa=180,1$) gemittelt, rücktransformiert, und eine neue Dichte wurde mit $2F_o - F_c$ Koeffizienten berechnet. Nach 10 Abgleichungszyklen war die Qualität der Karte gut ($R_{\text{back}}=27,3$ %). Die einzelnen Untereinheiten wurden entsprechend ihrer charakteristischen Insertionen, Deletionen und Aminosäuresequenzen identifiziert und wurden in die Karte auf einer ESV-30 Graphiksystem Arbeitsstation (Evans & Sutherland, Salt Lake City, Utah) unter Verwendung von FRODO (Jones (1978), J. Appl. Cryst. 11, 268-272) eingebaut. Eine kristallographische Verfeinerung erfolgte mit X-PLOR (Bruenger, 1992) mit energetisch und zweifach nicht-kristallographischen Symmetriebeschränkungen unter Verwendung der von Engh und Huber (1991), Acta Cryst. A 47, 392 - 400, beschriebenen Parameter. Zusätzlich wurde zur Korrektur für eine anisotrope Kristallordnung ein Streuungsbeitrag für das Lösungsmittel berechnet und während der Verfeinerung in die Berechnung des Modells einbezogen.

15
20
25
30
35

Das fertige Modell berücksichtigte die Inhibitormoleküle Lactacystin und Acetyl-Leu-Leu-Norleucinal, 18 Magnesiumionen, bzw. 1.800 Wassermoleküle. Die R-Werte sind zufriedenstellend und die Standardgeometrie der Bindungen und Winkel hervorragend. Die lokale molekulare diadische Symmetrie ist gut konserviert, was auch durch den sehr geringen Wert R_{back} 13 % in der Endstufe der Analyse gezeigt wird. Der Anstieg im R-Wert um 3 % für Daten mit einer Auflösung von 0,28 nm gegenüber 0,24 nm ist eine Folge der anisotropen Kristallordnung, welche die Datenqualität beeinträchtigt, und der beschränkten Einbeziehung geordneter Lösungsmittelmoleküle.

Beispiel 4 Charakterisierung der Struktur

4.1 Struktur von Untereinheiten

Die 14 aus Hefe klonierten Gene, die für Komponenten des 20S Proteasoms kodieren, können in sieben α -Typ und sieben β -Typ-Untereinheiten eingeteilt werden.

20

Die β -Typ Untereinheiten werden als Prekursoren synthetisiert, die zu den im assemblierten Proteasom vorliegenden reifen Formen prozessiert werden. Die reifen β -Typ Polypeptide $\beta 2/PUP1$, $\beta 5/PRE2$ und $\beta 1/PRE3$ werden aus ihren Proformen durch Spaltung zwischen Gly-1 und Thr1 unter Freisetzung der aktiven Stelle Thr1 erhalten, während $\beta 7/PRE4$ zwischen Asn-9 und Thr-8 und $\beta 6/C5$ zwischen His-10 und Gln-9 gespalten werden und als stabile Prozessierungsintermediate vorliegen. $\beta 4/C11$ und $\beta 3/PUP3$ werden nicht prozessiert und beginnen mit Met(-1) bzw. Met(-9). Die Untereinheiten PUP1, PRE2 und PRE3 werden als vollständig prozessiert, die Untereinheiten PRE4 und C5 als teilweise prozessiert und die Untereinheiten C11 und PUP3 als unprozessiert bezeichnet.

Alle 14 Untereinheiten liegen in der kristallinen molekularen Struktur an eindeutigen Positionen vor. Sie sind fast voll-

ständig definiert durch die Elektronendichte abgesehen von einigen Kettentermini und langen Insertionssegmenten.

Die Elektronendichte für die Hauptketten ist in den α -Typ-Untereinheiten wie folgt definiert: $\alpha 2/Y7$: Thr5-Leu236, $\alpha 3/Y13$: Gly4-Gly237, $\alpha 4/PRE6$: Tyr8- Gln244, $\alpha 5/PUP2$: Arg10- Glu243 (7 Reste der Insertion sind nicht definiert - Gly12 bis Arg 126), $\alpha 6/PRE5$: Phe4 - Ile233, $\alpha 7/C1$: Gly5 - Asn241, $\alpha 1/C7$: Gly6 - Asp240.

10

In den β -Typ-Untereinheiten ist die Elektronendichte wie folgt definiert: $\beta 3/PUP3$: Ser-8-Asp 193, $\beta 6/C5$: Gln-9-Asp 193, $\beta 4/C11$: Met-1-Gln192, $\beta 7/PRE4$: Thr-8-Ile211, $\beta 2/PUP1$: Thr1-Cys221, $\beta 1/PRE3$: Thr1-Leu196, $\beta 5/PRE2$: Thr1-Gly211.

15

Alle sieben α - und β -Typ-Polypeptide haben eine charakteristische β -Sandwich-Struktur. Sie ist gebildet aus zwei fünfsträngigen antiparallelen β -Faltblattstrukturen mit den darüberliegenden helicalen Schichten aus den Helices H3, H4, H5 und den darunterliegenden Helices H1 und H2 gebildet ist. Sie unterscheiden sich aber in den Knicken, die um eine oder zwei Aminosäurereste in der Länge variieren, in langen Insertionen, die Sekundärstrukturelemente verbinden, sowie in den N-terminalen und insbesondere in den C-terminalen Regionen.

25

Bei den α -Typ-Untereinheiten hat $\alpha 2/Y7$ eine lange Insertionschleife zwischen den Strängen S9 und S10, die aus einer kurzen α -Helix und einem β -Strang aufgebaut ist. $\alpha 1/C7$ weist eine Verlängerung der Helix H3 um zwei Knicke durch die Insertion bei G180 auf. Die Untereinheiten $\alpha 1/C7$, $\alpha 3/Y13$, $\alpha 4/PRE6$, $\alpha 5/PUP2$ und $\alpha 7/C1$ haben längere C-terminale Helices H5, die aus der Teilchenoberfläche in die Lösung hervorstehen. Die hoch geladenen, meist sauren C-terminalen Segmente sind unstrukturiert.

35

Bei den β -Typ-Untereinheiten mit langen Insertionen hat $\beta 7/PRE4$ einen deutlichen Knick zwischen den Helices H1 und H2

und eine zusätzliche α -Helix mit 2 Knicken bei Rest 145. $\beta 6/C5$ hat eine Insertion von 17 Resten zwischen H3 und H4 mit einer komplexen Faltung und einer kurzen Helix. $\beta 2/PUP1$ hat eine sehr lange C-terminale Extension, die in ihren letzten 11 Resten stark ungeordnet ist. Die Untereinheiten $\beta 3/PUP3$ und $\beta 6/C5$ haben kurze C-Termini, so daß die Helices H5 nicht existieren, und die Stränge S10 verlängert sind, um das β -Faltblatt zu vergrößern. In $\beta 4/C11$ existiert die Helix H5, ist aber um 2 Knicke kürzer als bei *T.acidophilum*.

10

Viele dieser Untereinheit-spezifischen Knicke, Insertionen und N- und C-Termini sind an Kontakten zwischen Untereinheiten beteiligt, wie im folgenden diskutiert wird.

15 4.2 Der (C7, Y7, Y13, PRE6, PUP2, PRE5, C1; PRE3, PUP1, PUP3, C11, PRE2, C5, PRE4) β -Komplex

Jede der sieben α -Typ-Untereinheiten hat zwei Nachbarn innerhalb des heptameren Rings, die α -cis-Wechselwirkungen aufweisen, und eine oder zwei in Nachbarschaft liegende β -Typ-Untereinheiten im anderen Ring mit α -trans- β -Wechselwirkungen. Die zentral lokalisierten β -Typ-Untereinheiten haben zusätzlich zu den β -cis und β -trans- α -Wechselwirkungen eine oder zwei in Nachbarschaft liegende β -Typ Untereinheiten im anderen β -Ring mit β -trans- β -Wechselwirkungen.

Die generelle Architektur der Quartärstruktur ist im Proteasom von *T.acidophilum* und Hefe gleich (Fig. 2): Das N-terminale Schleifensegment, Helix H0 (Reste 20 bis 30), Schleife L, die H2 und S5 verbindende Schleife und der Strang S7 vermitteln α -cis-Wechselwirkungen. Die β -cis-Kontakte, die weniger eng zu sein scheinen, umfassen die Schleife L, das N-Ende der Helix H1, den Strang S7 und den den Strang S8 und die Helix H3 verbindenden Knick. Diese Kontakte stammen aus dem D7-symmetrischen Vorläufer und finden sich auch im *T.acidophilum* Proteasom. Trotz der konservierten Architektur sind diese Kontakte

aufgrund ihrer spezifischen Aminosäuresequenzen für die jeweiligen Untereinheiten spezifisch.

Es gibt viele zusätzliche Kontakte, die in *T. acidophilum* fehlen, und durch Sequenzen und Sequenzinsertionen bewirkt werden, die für Hefe und Eukaryonten im allgemeinen charakteristisch sind. Innerhalb der α -Ringe werden enge α -cis-Kontakte durch die verschlungenen N-Termini der Untereinheiten $\alpha 1/C7$, $\alpha 2/Y7$, $\alpha 3/Y13$ und $\alpha 7/C1$ im Zentrum des heptameren Rings hergestellt. Das in allen Untereinheiten konservierte Tyr8 spielt eine zentrale Rolle. Innerhalb der β -Ringe existiert ein sehr spezifischer Kontakt zwischen $\beta 2/PUP1$ und $\beta 3/PUP3$, der durch den langen C-terminalen Arm von PUP1 vermittelt wird, der PUP3 umfaßt und fast den übernächsten Nachbarn $\beta 4/C11$ berührt. β -trans- α -Kontakte erfolgen durch die Helix H1-Schleife-Helix H2 Motive, welche mit den gleichen Motiven von zwei benachbarten α -Untereinheiten wechselwirken. Dieses grundlegende Kontaktmotiv war auch in der *T. acidophilum* Struktur zu sehen (siehe Figur 4a bei Löwe et al. (1995), Science 268, 3479-3486), aber die Insertion bei Rest 66 von $\beta 7/PRE4$ begünstigt dessen Assoziierung mit $\alpha 6/PRE5$ und $\alpha 7/C1$. In ähnlicher Weise bindet die lange Insertion in $\alpha 2/Y7$ bei Rest 210 zwischen den Strängen S9 und S10 an $\beta 2/PUP1$ und koppelt dieses Paar. Spezifische β -trans- β -Wechselwirkungen werden durch den C-terminalen Arm von $\beta 7/PRE4$ gebildet, der zwischen $\beta 2'/PUP1$ und $\beta 1'/PRE3$ eingelagert ist. Das C-terminale Segment von $\beta 5/PRE2$ wechselwirkt mit $\beta 3'/PUP3$ und $\beta 4'/C11$ auf ähnliche Weise (Figur 3). Die lange Insertion von $\beta 6/C5$ am Rest 145 kontaktiert Untereinheit $\beta 3'/PUP3$ und den C-terminalen Arm von $\beta 2'/PUP1$.

30

Sehr spezifische β -trans- β -Wechselwirkungen werden durch Magnesiumionen vermittelt: Magnesium Y8 verbrückt das Hauptkettencarboxylat von Asp193 aus $\beta 6/C5$ mit der Schleife 162 bis 167 von $\beta 2'/PUP1$. Auf gleiche Weise verbrückt das Magnesium Y9 die Untereinheit $\beta 3/PUP3$ über Asp193 mit $\beta 5'/PRE3$. Darüber hinaus sind diese Carboxylatgruppen Liganden für andere Magnesiumionen, die in den Schleifen 165 von $\beta 4/PUP3$ (Magnesium W6)

35

bzw. $\beta 6/C5$ (Magnesium W4) lokalisiert sind und die eine Rolle in der Stabilisierung der Untereinheitenstruktur spielen können. Die Aspartatreste sind vollständig verdeckt und ihre Seitenketten an Ladung-Ladung-Wechselwirkungen mit Arg 19 von $\beta 2'/PUP1$ bzw. Arg 19 von $\beta 5'/PRE2$ beteiligt, wodurch die β -trans- β -Kontakte weiter verstärkt werden. Die β -Typ Untereinheiten $\beta 1/PRE3$ und $\beta 4/C11$ liegen an der einzigen Moleküldiade des Hefeproteasoms und sind sehr ähnlich dem dominanten β -trans- β -Kontakt an den Resten 133-137 der Helix H3 von *T. acidophilum*.

18 Magnesiumpositionen wurden im Proteasommolekül identifiziert, von denen 12 auf den Innenwänden der β - β -Kammer lokalisiert sind und die im Folgenden diskutierte saure Natur dieses Kompartments belegen. Es ist erkennbar, daß die Vielzahl spezifischer Wechselwirkungen zwischen den Untereinheiten deren spezifische und eindeutige Positionen innerhalb des Proteasoms bestimmt.

20 4.3 Die N-terminale Threoninposition

Im *T. acidophilum* Proteasom wurde durch Struktur- und Mutationsuntersuchungen ein katalytisches System mit Thr1, Glu17 und Lys33 definiert (Löwe et al. (1995), supra und Seemüller et al. (1995), Science 268, 579-582).

Nahe an Thr 1 befinden sich die Reste Ser129, Ser169 und Asp166, die für die strukturelle Integrität dieser Stelle erforderlich sind, aber auch an der Katalyse beteiligt sein könnten. Durch Mutagenese wurde gezeigt, daß Asp166 im Proteasom von *T. acidophilum* essentiell ist (Seemüller et al. (1996), Nature 382, 468-470). Diese Reste sind in den aktiven Untereinheiten PUP1, PRE2 und PRE3 invariant.

35 Zusätzlich wurde ein vollständig gebundenes Lösungsmittelmolekül NUK in allen drei Untereinheiten nahe bei Thr10' und N, Ser1290' und N und Gly47N gefunden, wie exemplarisch für die

Untereinheit $\beta 5$ /PRE2 im Lactacystin-Komplex (Figur 4) gezeigt ist. Dies wurde bei einer geringeren Auflösung im Modell von *T. acidophilum* nicht erkannt. Thr1N hat Wasserstoffbrücken zu Ser168O und O γ und Ser129O γ . Thr1O γ hat eine Wasserstoffbrücke zu Lys33 ϵ . Asp17 hat Wasserstoffbrücken über O $\delta 1$ zu Arg19N und Gly170N und über O $\delta 2$ zu Thr/Ser2N und Lys33N ϵ . Auf ähnliche Weise hat Lys33N ϵ drei Wasserstoffbrücken zu Asp17O $\delta 2$, Arg19O und Thr1O γ .

Das Muster von Wasserstoffbrücken läßt vermuten, daß sowohl Asp17 als auch Lys33 geladen sind. Thr1N kann eine Wasserstoffbrücke zu ThrO γ ausbilden und ist vermutlich neutral, ein Zustand der durch einen nahegelegenen positiv geladenen Lysinrest begünstigt wird. Eine solche Ladungsverteilung wäre auch aufgrund der jeweiligen Standard-pKa-Werte zu erwarten. Thr1N ist daher höchswahrscheinlich der Protonenakzeptor, wenn Thr1O γ an einem elektrophilem Zentrum beteiligt ist. Dies wird durch die Struktur des Lactacystinkomplexes bestätigt, der einen Ester zwischen Lactacystin und Thr1 als Ergebnis einer β -Lacton-Ringöffnung nach einem nukleophilen Angriff durch Thr1O γ aufweist. Thr1N ist genau an der Position, um als Protonenschuttle von Thr1O γ zum Lactacystin-O6 γ zu dienen. Eine analoge Reaktionssequenz wird für die Hydrolyse des C-terminalen Fluorophoren von fluorogenen Substraten vorgeschlagen, wobei der Protonentransfer im Amidstickstoff der Abgangsgruppe erfolgt. Das erzeugte Acyl-Enzym wird, wie in den Abschnitten D-E von Figur 5 gezeigt, durch das Wasser NUK deacyliert. Alternativ oder parallel könnte ein direkter Angriff von NUK auf die Peptidbindung erfolgen, wobei das Intermediat I umgangen wird.

4.4 Inhibitorbindung

$\beta 3$ /PUP1, $\beta 1$ /PRE3 und $\beta 5$ /PRE2 haben den Inhibitor Acetyl-Leu-Leu-Norleucinal kovalent an Thr1O γ vermutlich als Hemiacetal gebunden. Er nimmt eine β -Konformation an und füllt die Lücke zwischen Strängen, welche die Reste 20 und 21 bzw. 47 enthalten (der Schleife L in Figur 3 bei Löwe et al., 1995, supra,

zugeordnet), an die er über Wasserstoffbrücken gebunden ist, wodurch eine antiparallele β -Faltblattstruktur erzeugt wird. Die Norleucinseitenkette reicht in eine Tasche (die S1 Tasche) hinein, die seitlich zu einem Tunnel hin offen ist, der zur Partikeloberfläche führt. Die Leucinseitenkette bei P2 ist nicht in Kontakt mit Protein und die Leucinseitenkette bei P3 ist in Kontakt mit der benachbarten β -Untereinheit. Die S1-Spezifitätstasche wird hauptsächlich durch die Reste 20, 31, 35, 49, 53 gebildet, d. h. Ala20, Val31, Ile35, Met45, Ala49, Gln53(K) in β 5/PRE2 (Fig. 6c), Thr20, Thr31, Thr35, Arg45, Ala49, Gln53 in β 1/PRE3 (Fig. 6a), Ser20, Cys31, His35, Gly45, Ala49, Glu53 in β 2/PUP1 (Fig. 6b). Der Rest 45 formt den Boden der Tasche und scheint weitgehend ihren Charakter zu bestimmen. Benachbarte Untereinheiten in den β -Ringern tragen weiter zu den S1-Taschen bei und modulieren deren Charakter: β 2/PUP1 im Falle von β 1/PRE3 mit His114, His116, Ser118, Asp120; β 3/PUP3 im Falle von β 2/PUP1 mit den Resten Asp114, Asp120 und Cys118 und β 6/C5 im Falle von β 5/PRE2 mit Ser118, Asp114, Glu120 und Glu122.

Lactacystin ist kovalent an β 5/PRE2 gebunden. Dies steht im Einklang mit der beobachteten chemischen Modifizierung von Untereinheit X des Säugerproteasoms (Fenteany et al., (1995), Science 268, 726-730) dem Homolog von PRE2. Seine Dimethylseitenkette bei C10 reicht wie eine Valin- oder Leucinseitenkette in S1 hinein, aber weniger tief als die Norleucinseitenkette von Calpain. Lactacystin bildet mehrere Wasserstoffbrücken mit Atomen der Proteinhauptkette LactN-Gly47O, LactO4'-Gly47N, LactO9'-Thr21N, LactO6'-Thr1N. Da diese zuletzt genannten Wechselwirkungen auch in β 2/PUP1 und β 1/PRE3 auftreten könnten, die keine kovalenten Komplexe mit Lactacystin bilden, scheint die S1 Seitengruppe, die in der hydrophoben S1 Tasche von β 5/PRE2 bindet, die Ausbildung einer kovalenten Bindung und deren Stabilisierung zu dirigieren. somit ist diese Seitengruppe ein wichtiger Ansatzpunkt zur Entwicklung von Inhibitoren.

4.5. Spezifität

β 5/PRE2 hat einen Methioninrest an Position 45 in Kontakt mit der verzweigten Seitenkette von Lactacystin im Komplex. Im Calpain-Inhibitor-Komplex drückt die Norleucinseitenkette von Calpain die Methioninseitenkette um bis 0,27 nm in Richtung auf Ile5, das aus dem Weg rotiert. Diese koordinierten Bewegungen machen die S1 Tasche geräumiger. Ihre sauren Seitenwände, die von der Untereinheit β 6/C5 stammen, ermöglichen auch die Bindung von basischen Resten, insbesondere Arginin. Dies steht im Einklang mit der Beobachtung, daß Lactacystin sowohl die chymotryptische als auch die tryptische Aktivität gegenüber chromogenen Substraten hemmt. Auf ähnliche Weise wird die chymotryptische Aktivität in Proteasomen mit einer β 5/PRE2 Mutante, die nicht aus ihrer Proform prozessiert werden kann (Chen & Hochstrasser (1996), Cell 86 961-972) und durch eine Mutation in β 5/PRE2 verringert, wo eine Substitution von Ala49 durch Val in der S1 Tasche die Größe beschränkt (Heinemeyer et al. (1993), J. Biol. Chem. 268, 5115-5120).

β 1/PRE3 hat einen Argininrest in Position 45 am Boden der S1 Tasche, die gut für Glutamat P1 Reste geeignet ist. Sie ist am wahrscheinlichsten die mit der Peptidylglutamyl-Peptid-Hydrolyseaktivität (PGPH) des Proteasoms assoziierte Untereinheit. Jedoch auch die Norleucinseitenkette besetzt diese basische Tasche im Calpaininhibitor-Komplex. Es wurde ein hoher zusätzlicher Dichtepeak beobachtet, der mit der Guanidiniumseitenkette assoziiert ist und als Chloridion interpretiert werden kann, welches eine nicht ausgeglichene positive Ladung kompensiert. β 2/PUP1 hat als Rest 45 ein Glycin und folglich eine geräumige, am Boden durch His35 begrenzte S1 Tasche.

Wir folgern, daß β 5/PRE2 sowohl die chymotryptische als auch die tryptische Aktivität enthält, während β 1/PRE3 die PGPH-Aktivität enthält, aber beide Taschen sind hinsichtlich der Größe (PRE2) und der Polarität (PRE3) anpassungsfähig. β 2/PUP1 ist für sehr große P1 Reste mit neutralem, saurem oder basischem Charakter geeignet, abhängig davon ob His35 oder die

saure β 3/PUP3 Seitenwand für den Ladungsausgleich sorgt. Mutationsanalysen haben gezeigt, daß Substitutionen in β 4/C11 und β 7/PRE4 die chymotrypsinartige bzw. die PGPH Aktivität beeinflussen (Heinemeyer et al. (1993), supra; Hilt & Wolf (1996), TIBS 21, 96-102; Hilt et al. (1993), J. Biol. Chem. 268, 3479-3486). Diese Untereinheiten sind inaktiv, aber in Nachbarschaft zu den Untereinheiten β 5/PRE2 und β 1/PRE3 aus beiden Ringen gelegten (Figur 4). Der Austausch von Ser136 durch das voluminöse Phe in β 4/C11 stört den β -trans- β -Kontakt an Helix H3 zwischen β 4/C11 und β 5/PRE2 und kann die benachbarte Thr1 Stelle stören, wie auch vermutlich die Deletion der 15 C-terminalen Reste von β 7/PRE4, die extensive Kontakte mit β 1/PRE3 bilden (Fig. 3).

4.6 Propeptide und Prozessierung

Fünf β -Typ-Untereinheiten werden mit Propeptiden unterschiedlicher Längen bis zu 75 Aminosäuren synthetisiert, die während der Reifung abgespalten werden. β 2/PUP1, β 5/PRE2 und β 1/PRE3 zeigen eine Autolyse zwischen Gly-1 - Thr1. Dies ist ein Prozeß, für den das Vorhandensein von Thr1, Gly-1 und Lys33 erforderlich ist. Wir hatten bereits eine Autolyse innerhalb der Untereinheit vorgeschlagen, wobei Thr10' als Nukleophil die vorangehende Peptidbindung angreift (Schmidtke et al. (1996), EMBOJ. 15, 6887-6898).

Gemäß der Kristallstruktur wird dem Wasser NUK eine zentrale Rolle zugeordnet. Es ist idealerweise so positioniert, um als Base bei der Entfernung eines Protons von Thr10' zu wirken und die nukleophile Addition an den Carbonylkohlenstoff von Gly-1 anzutreiben. Es gibt keine Informationen über die Position und Orientierung der Gly-1-Thr1-Peptidgruppe in den vollständig prozessierten Untereinheiten, aber wir können sie von teilweise prozessierten oder unprozessierten Untereinheiten β 3/PUP3, β 6/C5 und β 7/PRE4 ableiten, welche ähnliche Orientierungen zeigen. Gly-10 ist in diesen Untereinheiten in Richtung des positiv geladenen LysN^f und von Gly47N gerichtet, die ein

Sauerstoffanionenloch in Analogie zu Serinproteasen bilden, um die entstehende negative Ladung zu verteilen, wenn das tetraedrische Addukt gebildet wird. Eine Umlagerung zum Ester kann nach dem Protonentransfer vom Wasser NUK zu Thr1N und Spaltung der Peptidbindung erfolgen. Die nahegelegenen Reste Ser1290' und Ser1690' unterstützen diese Reaktion. Beide Hydroxylgruppen sind über Wasserstoffbrücken an Asp166 gebunden, welches in den aktiven Untereinheiten invariant ist. NUK ist wahrscheinlich ebenfalls bei der Esterhydrolyse als angreifendes Nukleophil beteiligt, welches schließlich in das Produkt eingebaut wird (Fig. 5, Abschnitte a bis c). Der Gly-1 Rest scheint essentiell zu sein, da eine Seitenkette an Position -1 mit dem Proteinrückgrat bei Position 168 interferieren und eine Konfiguration erzwingen würde, die für eine Autolyse ungeeignet ist.

Mit Freisetzung von Thr1 werden die Untereinheiten aktiv. Wenn die katalytische Stelle nicht intakt ist, wie in den Untereinheiten $\beta 3/\text{PUP3}$, $\beta 6/\text{C5}$ und $\beta 4/\text{C11}$, denen Thr1 fehlt, in $\beta 7/\text{PRE4}$, bei dem Lys33 durch Arg ersetzt ist, und in konstruierten Varianten von LMP2, dem Säugerhomolog von $\beta 1/\text{PRE3}$ (Schmidtke et al. (1996), supra) und von PRE2 (Chen & Hochstrasser (1996), supra) tritt eine Autolyse bei Rest 1 nicht auf. $\beta 7/\text{PRE4}$ besitzt beide essentiellen Reste Gly-1 und Thr1, aber in einer Konfiguration, die sich stark von derjenigen unterscheidet, die in den aktiven Untereinheiten gefunden wird, da die Thr1 Seitenkette durch das größere Arg33 weggedrückt wird, welches den Lysinrest ersetzt (Figur 4b). Das Auffinden von Defekten in der katalytischen Aktivität und in der Prozessierung belegt die strukturelle Labilität der Thr1-Stelle, die durch Mutationen von benachbarten Resten der gleichen oder benachbarten Untereinheiten gestört werden kann. Andererseits ist es auch möglich, daß eine inaktive Mutante in der Umgebung aktiver Untereinheiten selbst aktiv werden kann, was im Einklang mit Beobachtungen steht, daß *T. acidophilum* Spezies, die einen Defekt in der Prozessierung aufweisen, bei

Koexpression mit Wild-Typ-Protein prozessiert werden (Seemüller et al. (1996), supra).

5 β 7/PRE4 und β 6/C5 sind Produktkomplexe der partiellen Prozessierungsreaktion und die Lokalisierung dieser Spaltstellen führt direkt zur den aktiven Stellen, die verantwortlich für diese Endopeptidase-Aktivität sind, unter der Annahme, daß nach der Spaltung keine Umlagerung stattfindet. Eine große Umlagerung scheint unwahrscheinlich, da die Propeptide fest an
10 den Proteinwänden gehalten werden, das PRE4 Propeptid eng an den Untereinheiten β 7/PRE4 und β 1/PRE3 und das C5 Propeptid eng an den Untereinheiten β 6/C5 und β 7/PRE4. Die Reste Thr-8 und Gln-9 liegen sehr nahe beieinander an der scharfkantigen inneren Ringfläche des β -Rings, der durch die C-Termini der
15 Helices H2 der sieben Untereinheiten gebildet wird. Speziell Thr-8 und Gln-9 liegen nahe an den Helices H2 der Untereinheiten β 1/PRE3 und β 7/PRE4 (Figur 7). Die vermutlichen Prozessierungsintermediate der Untereinheiten β 1/PRE3, β 2/PUP1 und β 5/PRE2 kommen ebenfalls auf der inneren Ringfläche des β -
20 Rings in einer Konformation zu liegen, die ähnlich wie die bei β 7/PRE4 und β 6/C5 ist. Eine intermediäre Protzessierung wird auch für die Mutante LMP2 mit einem defekten katalytischen Apparat (Schmidtke et al. (1996), supra) und vermutlich auch für β 5/PRE2 gefunden, wie aus dem Molekulargewicht von Inter-
25 mediaten nach Puls-Chase-Experimenten zu vermuten ist (Chen und Hochstrasser (1995), supra). Dies ist besonders bemerkenswert, da β 5/PRE2 keinen aktiven Nachbarn hat, der einen partielle Prozessierung über ein N-terminales Threonin durchführen könnte.

30

Proteasomen haben eine sehr breite Sequenzspezifität, die aber sehr längenrestringiert ist (Ehring et al. (1996), Eur. J. Biochem. 235, 404-415), um Peptide mit einer Länge von etwa 8 Aminosäureresten zu erzeugen. Auf Basis der *T. acidophilum* 20S
35 Proteasomenstruktur hatten wir vorgeschlagen, daß der Abstand von 2,8 nm zwischen den aktiven Thr1 Stellen von benachbarten Untereinheiten die Länge des durch eine sequentiell fort-

schreitende Proteolyse erzeugten Peptidprodukts bestimmt (Löwe et al. (1995) supra; Stock et al. (1996), Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology LX, 525-532; Dick et al. (1991), Biochemistry 30, 2725-2734).

- 5 Die Beobachtung von Prozessierungsintermediaten lassen vermuten, daß zusätzlich zu den N-terminalen Threoninresten eine zweite hydrolytische Stelle aktiv ist, die wir an der Innenfläche des β -Rings lokalisieren. Wir nehmen daher an, daß die
- 10 innere Ringfläche die Hauptstelle der Endopeptidaseaktivität ist. Ein Polypeptidsubstrat wird sich mit seinem C-Terminus an Thr1 anlagern, wobei ein Muster von Wasserstoffbrückenbindungen, ähnlich wie es bei den Tripeptid-Aldehyden auftritt, gebildet wird. Die Acyl-Enzym-Bildung würde eine vorangehende
- 15 Spaltung der Peptidbindung ähnlich wie die Autolysereaktion erfordern, und die Proteolyse würde daher von einer internen Stelle starten. Sterische Beschränkungen würden in diesem Fall eine scharf gebogene Konformation an der zu spaltenden Peptidbindung erfordern und die Reaktion würde wie in Figur 5, Ab-
- 20 schnitte d bis f gezeigt, verlaufen. Die Reste -9 oder -8 würden dann auf der inneren Ringfläche zu liegen kommen, wenn sie wie $\beta 6/C5$ und $\beta 7/PRE4$ Propeptide gebunden sind. Wir nehmen an, daß Wassermoleküle, die durch die 3 bis 4 Carbonylsauerstoffe der Hauptkette an den Helixenden von jeder der sieben
- 25 Untereinheiten (Fig. 5) aktiviert werden, als Base und Säure wirken, so daß eine Hydrolyse stattfinden kann. 18 Magnesiumstellen wurden im Proteasommolekül identifiziert, von denen 12 an den Innenwänden der β - β -Kammer lokalisiert sind. Diese belegen die saure Natur dieses Kompartements. Es gibt keine
- 30 ersichtliche Peptid-Tasche an diesen Stellen, so daß die Spaltung im Einklang mit dem scheinbaren Mangel jeglicher Spezifität gegenüber längeren Peptidsubstraten unspezifisch sein kann.
- 35 Die Propeptide spielen eine essentielle Rolle bei der Assemblierung eukaryontischer Proteasomen, was auf direkte oder indirekte Effekte durch Teilnahme an Wechselwirkungen zwischen

Untereinheiten und/oder durch Stabilisierung der Struktur von Untereinheiten zurückzuführen sein kann. Die beobachteten Strukturen der Prozessierungsintermediate von $\beta 7/\text{PRE4 (M)}$ und $\beta 6/\text{C5}$ und des unprozessierten Propeptids $\beta 3/\text{PUP3}$ geben Hinweise darauf, daß beide Effekte auftreten, da die Propeptide fest an den Rest des Proteins gebunden sind und mit anderen Untereinheiten wechselwirken, z. B. Propeptid $\beta 7/\text{PRE4}$ mit $\beta 1/\text{PRE3}$ bei den Resten 92 und 115 und Propeptid $\beta 6/\text{C5}$ mit $\beta 7/\text{PRE4}$ bei 91 und 116.

10

4.7 Eintritt in das und Austritt aus dem Proteasompartikel

Die hydrolytische Aktivität des Proteasoms ist mit Thr1 und der β -Ringflächen im Inneren des die hydrolytische Kammer definierenden β -Hohlraums assoziiert. Das Substrat muß in das Partikel eindringen und das Produkt muß freigesetzt werden. Beim Proteasom von *T. acidophilum* sind zwei Eintrittsöffnungen mit einem Durchmesser von etwa 1,3 nm an den Enden der zylindrischen Teilchen offen, die durch eine Ringfläche von Knickbildenden Segmenten Tyr126-Gly-Gly-Val der sieben identischen α -Untereinheiten begrenzt sind. Die N-terminalen Reste 1 bis 12 sind in diesem Protein ungeordnet.

Im Gegensatz dazu ist die hydrolytische Kammer des 20S Proteasoms der Hefe fast unzugänglich. Die N-Termini der Untereinheiten $\alpha 1/\text{C7}$, $\alpha 2/\text{Y7}$, $\alpha 3/\text{Y13}$, $\alpha 6/\text{PRE5}$ und $\alpha 7/\text{C1}$ reichen in die Öffnung hinein und füllen sie vollständig mit mehreren Schichten von eng miteinander verwobenen Seitenketten aus (Figur 8). Es gibt somit keinen Zugang in das Innere des Partikels von den Zylinderenden ohne erhebliche Umlagerung. Es gibt einige enge Seitenfenster, insbesondere an der Grenzfläche zwischen den α - und β -Ring, die durchlässiger sind als im *T. acidophilum* Proteasom, da kleinere Seitenketten dort vorliegen. Diese Öffnungen befinden sich hauptsächlich zwischen den zahnartigen Helix H1-Knick-Helix H2-Motiven der α - β -Grenzfläche (siehe Figur 4a bei Löwe et al. (1995), supra) und führen zu den N-terminalen Threoninresten des aktiven Zentrums. Sie sind mit

polaren und geladenen Aminosäureseitenketten bedeckt, die sich bewegen können, um Öffnungen mit etwa 1 nm Durchmesser zu erzeugen und möglicherweise die Passage von ungefalteten gestreckten Polypeptidketten erlauben. Das 19S Partikel, welches die ATP- und Ubitiquin-Abhängigkeit der Proteolyse durch das Proteasom bewirkt, ist an die Partikel angeheftet um das 26S Proteasom zu bilden. Die Assoziierung führt zu einer starken Aktivierung der Peptidhydrolyse (Hoffman und Rechsteiner (1994), J. Biol. Chem. 269, 1690-16895). Auf ähnliche Weise ist der Proteasomregulator PA28 an α -Typ Untereinheiten gebunden (Kania et al. (1996), Euro. J. Biochem. 236, 510-516). Er beschleunigt die Peptidspaltung und verbessert die Antigenprozessierung. Beide regulatorischen Faktoren könnten die Eingangsöffnungen auf kontrollierte Weise in vivo öffnen.

4.8 Erzeugung von MHC Klasse I Peptiden

Das 20S Proteasom erzeugt Peptidprodukte mit einer engen Längenverteilung, überwiegend Octa- oder Nonapeptide, ein Größenbereich, der optimal für die Bindung von MHC Klasse I Molekülen ist (York & Rock (1996), Annu. Rev. Immunol. 14, 369-396). In vitro Untersuchungen haben gezeigt, daß durch 20S Proteasomen aus intakten Proteinen erzeugte Peptide durch MHC Klasse I Moleküle präsentiert werden (Dick et al. (1994) Immunol. 152, 3884-3894; Niedermann et al. (1996), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 8572-8577). In einem in vivo Experiment wurde gezeigt, daß Proteasomeninhibitoren die MHC Klasse I Präsentation von Proteinantigenen hemmen (Rock et al. (1994), Cell 78, 761-771) und daß die Anzahl der an der Zelloberfläche vorliegenden MHC Klasse I Moleküle durch die induzierbaren Proteasomenuntereinheiten $\beta 5i$ /LMP7 und $\beta 1i$ /LMP2 reguliert wird, wie in Mäusen mit zielgerichteten Deletionen der für diese Proteine codierenden Gene gezeigt wurde (Fehling et al. (1994) Science 265, 1234-1237). LMP2 und LMP7 ersetzen nach IFN- γ Stimulierung die konstitutiv exprimierten Untereinheiten.

MHC Klasse I Peptide haben üblicherweise basische oder hydrophobe C-terminale Reste (siehe den Übersichtsartikel von Engelhard (1994), Curr. Opin. Immunol. 6, 13-23). Die LMP2/7 Substitution ändert vermutlich die Verteilung von Peptiden, so daß ein größerer Anteil der von MHC Klasse I Molekülen bevorzugten Peptiden erzeugt wird. LMP2 ersetzt Y, das humane Homologe von $\beta 1$ /PRE3, LMP7 ersetzt X, das Homologe von $\beta 5$ /PRE2. Alle Mitglieder dieser Unterfamilie zeigt einen hohen Grad an Sequenzidentität, aber $\beta 1$ i/LMP2 hat zwei auffällige Unterschiede gegenüber $\beta 1$ /PRE3 in der S1 Tasche: Thr31 \rightarrow Phe und Arg45 \rightarrow Leu. Durch den Austausch von Arg gegen Leu wird die Tasche unpolar und durch den Austausch von Thr gegen Phe enger, so daß die PGPH-Aktivität verringert und die chymotryptische Aktivität erhöht werden sollte, wenn LMP1 das Säugerhomolog für PRE3 ersetzt. Dies wird in der Tat beobachtet (Gaczynska et al. (1993), Nature 365, 264-267; Driscoll et al. (1993), Nature 365, 262-264) wenn LMPs durch eine Behandlung mit IFN- γ induziert werden. Die gegenteilige Wirkung findet man in Zelllinien, denen die LMP2 und LMP7 Gene fehlen und in Mutantenmäusen mit einer Disruption des LMP2 Gens (Van Kaer et al. (1994), Immunity 1, 533-541). Ein Ersetzen der Säugerhomologen von $\beta 5$ /PRE2 und $\beta 1$ /PUP1 durch LMP7 bzw. MECL1 beeinflußt nicht direkt die S1 Taschen und ihre Effekte können nicht von einer Änderung der Spezifität bei P1 stammen, wie man sie für LPM2 findet.

Im Hefe 20S Proteasom werden die Untereinheiten $\beta 7$ /PRE4 bzw. $\beta 6$ /C5 an den Resten -8 und -9 teilweise prozessiert. Dabei entstehen Octa- oder Nonapeptidprodukte, die nicht aus dem Enzym freigesetzt werden. Beide Peptide haben ähnliche Konformationen mit einer Verdickung, die zwei Abschnitte mit langgestreckter Konformation unterteilt, was der Konformation von MHC Klasse I-gebundenen Peptiden ähnelt. Durch Vergleich des Propeptids von $\beta 6$ /C5 mit einem viralen Peptidnonamer im Komplex mit seinem MHC Klasse I Rezeptor (Madden et al. (1992), Nature 321-325) wird die Ähnlichkeit mit rms Abweichungen für alle Atome von 0,23 nm und für die C α -Atome von 0,13 nm

quantifiziert und läßt vermuten, daß bevorzugte lokale Konformationen eine Rolle bei der Erzeugung (durch das Proteasom) und Präsentation (durch MHC Klasse I Moleküle) von immundominanten Peptidpitopen spielen.

Ansprüche

1. Verfahren zum Gewinnen einer aufgereinigten eukaryontischen Proteasomenpräparation, umfassend die Schritte:
 - (a) Herstellung eines Rohextrakts durch Aufschluß von eukaryontischen Zellen,
 - (b) Abtrennung unlöslicher Bestandteile aus dem Rohextrakt,
 - (c) chromatographische Auftrennung in Fraktionen über ein Ionenaustauschermedium,
 - (d) Testen der in Schritt (c) erhaltenen Fraktionen und Sammeln der aktiven Fraktionen,
 - (e) chromatographische Auftrennung über Hydroxyapatit,
 - (f) Testen der in Schritt (e) erhaltenen Fraktionen und Sammeln der aktiven Fraktionen,
 - (g) Konzentrierung der vereinigten Fraktionen,
 - (h) chromatographische Auftrennung über ein Gelfiltrationsmedium und
 - (i) Testen der in Schritt (h) erhaltenen Fraktionen und Sammeln der aktiven Fraktionen.
2. Verfahren nach Anspruch 1
dadurch gekennzeichnet,
daß man Hefezellen verwendet.
3. Verfahren nach Anspruch 1,
dadurch gekennzeichnet,
daß das Testen der Fraktionen in Schritt (d), (f) oder/und (i) jeweils zwei Bestimmungen der proteolytischen Aktivität umfaßt, wobei eine in Abwesenheit und die andere in Gegenwart eines Proteasomeninhibitors durchgeführt wird.
4. Verfahren nach Anspruch 3,
dadurch gekennzeichnet,
daß man Lactacystin als Proteasomeninhibitor verwendet.

5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4,
dadurch gekennzeichnet,
daß mindestens einer der chromatographischen
Trennschritte in einem FPLC-System durchgeführt wird.
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5,
weiterhin umfassend das Kristallisieren der aufgereinig-
ten Protesomenpräparation.
7. Aufgereinigte eukaryontische Proteasomenpräparation,
erhältlich durch das Verfahren nach einem der Ansprüche 1
bis 5.
8. Aufgereinigte eukaryontische Proteasomenpräparation in
kristallisierbarer Form.
9. Aufgereinigte kristallisierte eukaryontische Proteasomen-
präparation.
10. Präparation nach Anspruch 9,
dadurch gekennzeichnet,
daß der Kristall einen Proteasomeninhibitor enthält.
11. Präparation nach Anspruch 10,
dadurch gekennzeichnet,
daß der Inhibitor ein Tripeptid-Aldehyd oder Lactacystin
ist.
12. Präparation nach einem der Ansprüche 7 bis 11,
dadurch gekennzeichnet,
daß sie ein Proteasom aus einer Hefe umfaßt.
13. Präparation nach Anspruch 12,
dadurch gekennzeichnet,
daß sie ein Proteasom aus *Saccharomyces cerevisiae* um-
faßt.

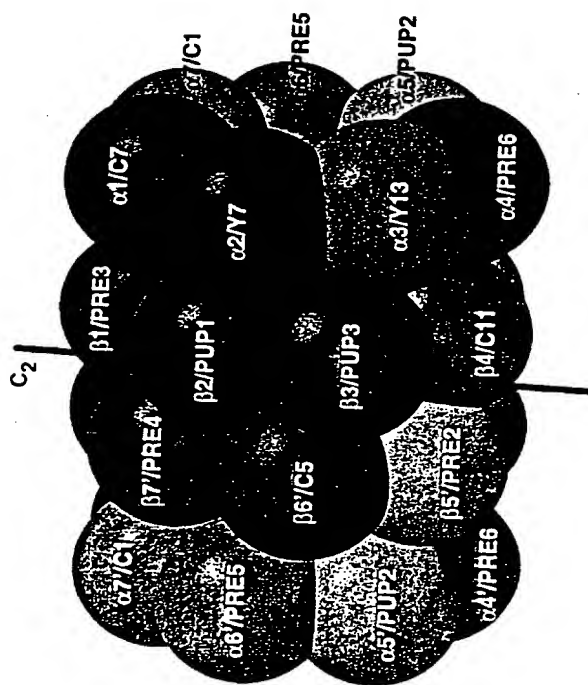
14. Präparation nach einem der Ansprüche 7 bis 13,
dadurch gekennzeichnet,
daß sie einen Komplex aus 28 Untereinheiten umfaßt, der
5 jeweils 2 Moleküle von 7 verschiedenen α -Typ-Unterein-
heiten und 7 verschiedenen β -Typ-Untereinheiten enthält.
15. Verwendung der aufgereinigten eukaryontischen Proteaso-
menpräparation nach einem der Ansprüche 7 bis 14 zur
10 Identifizierung und Gewinnung neuer Proteasomeninhibito-
ren.
16. Verwendung von Daten aus der Kristallstruktur von kri-
stallisierten eukaryontischen Proteasomenpräparationen
15 nach einem der Ansprüche 9 bis 14 zur Identifizierung und
Gewinnung neuer Proteasomeninhibitoren.
17. Verwendung von Kristallstrukturdaten aus dem Bereich der
Proteasomentaschen S1 der Untereinheiten β 1/PRE2, β 2/PUP2
20 oder/und β 5/PRE2 zur Identifizierung und Gewinnung neuer
Proteasomeninhibitoren.
18. Verwendung nach einem der Ansprüche 15 bis 17 in einem
computergestützten Modellprogramm.
25
19. Verwendung nach Anspruch 18, umfassend einen Schritt des
Homologiemodelling, indem die Kristallstrukturdaten eines
Hefeproteasoms mit Aminosäuresequenzen aus dem humanen
Proteasom modifiziert werden.
30
20. Neuer Proteasomeninhibitor,
dadurch gekennzeichnet,
daß er eine zur Proteasomentasche S1 der Untereinheiten
35 β 1/PRE3, β 2/PUP2 oder/und β 5/PRE2 komplementäre dreidi-
mensionale Struktur aufweist.

Zusammenfassung

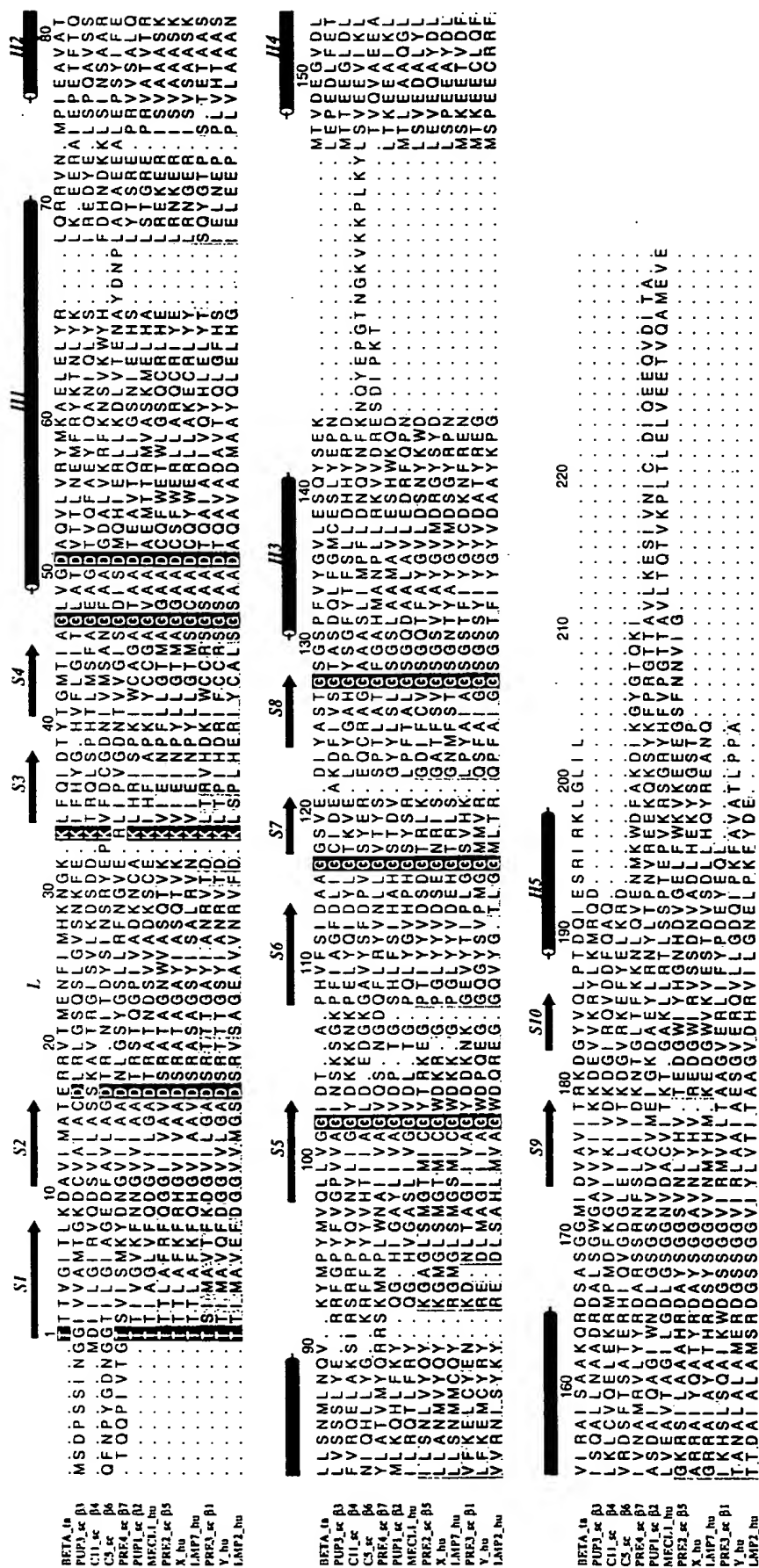
Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum Gewinnen einer aufgereinigten eukaryontischen kristallisierbaren Proteasomen-Präparation und die durch das Verfahren erhältliche Proteasomen-Präparation. Weiterhin betrifft die Erfindung eine aufgereinigte eukaryontischen Proteasomen-Präparation in kristallisierter Form. Mit Hilfe der Kristalldaten aus dieser Proteasomen-Präparation können neue Proteasomen-Inhibitoren, insbesondere mit Hilfe von computergestützten Modelling-Programmen identifiziert und gewonnen werden.

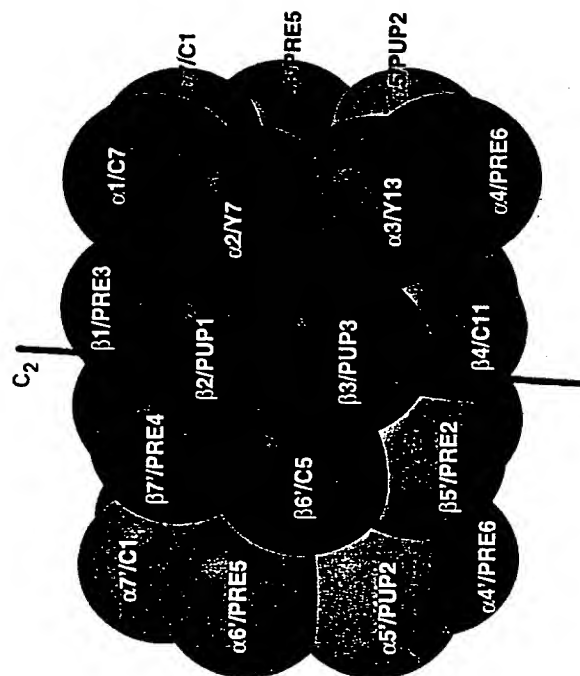
15

vo 18.03.97 12:53

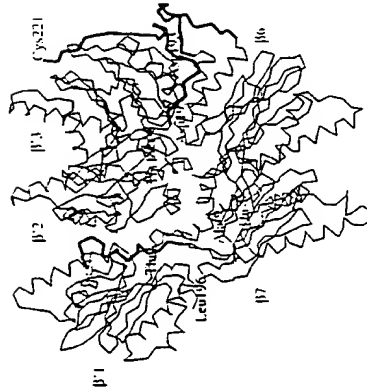
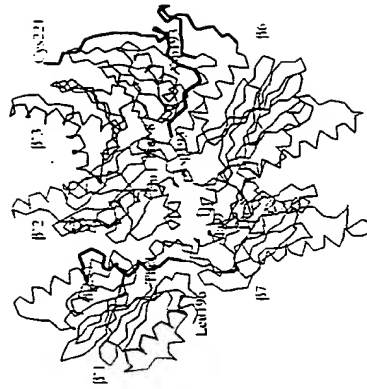


7/13



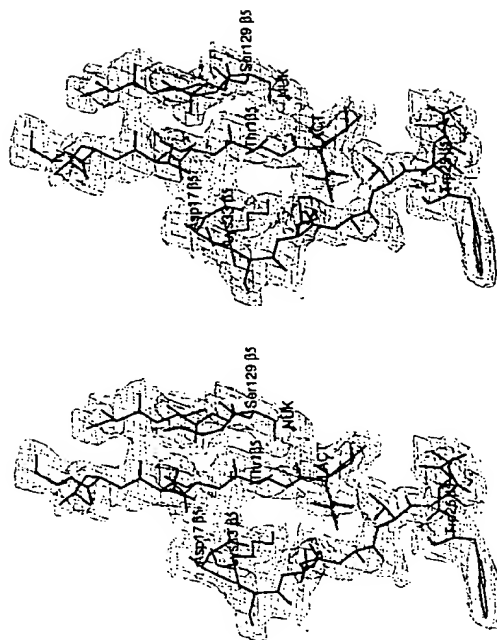


Figur 2



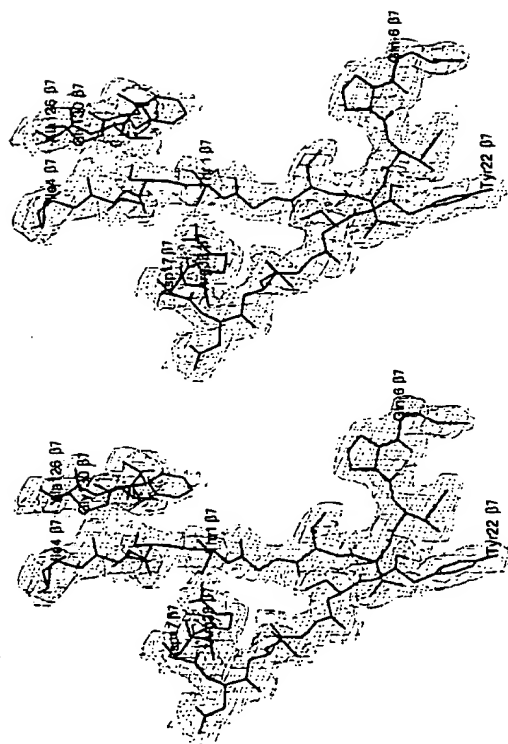
Figur 3

4/11



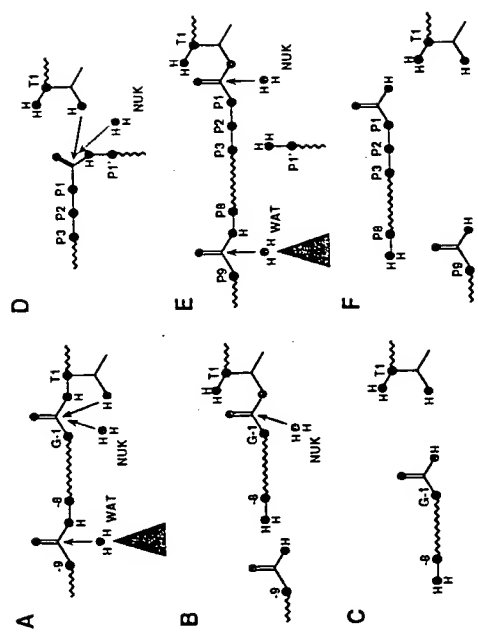
klac map2

Figur 4a

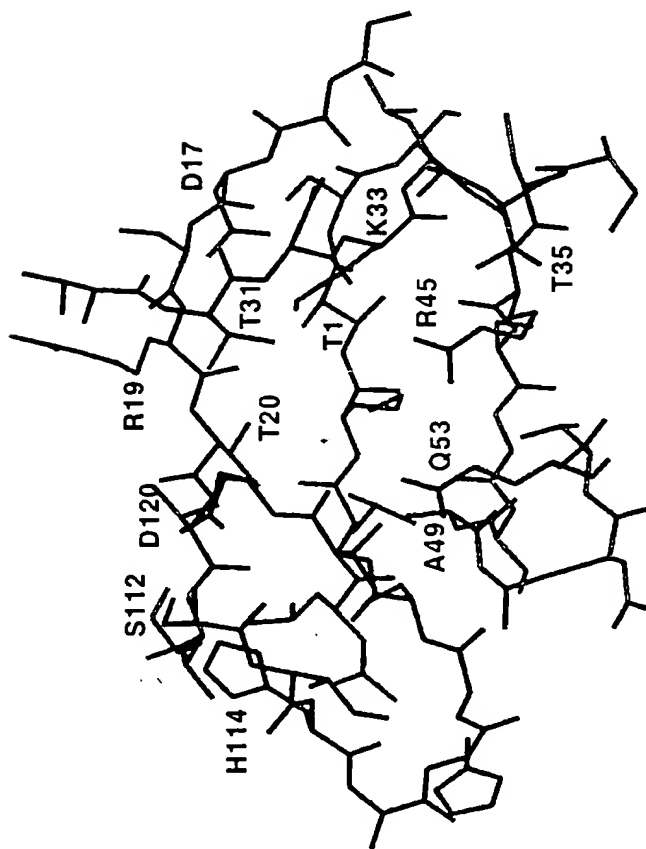
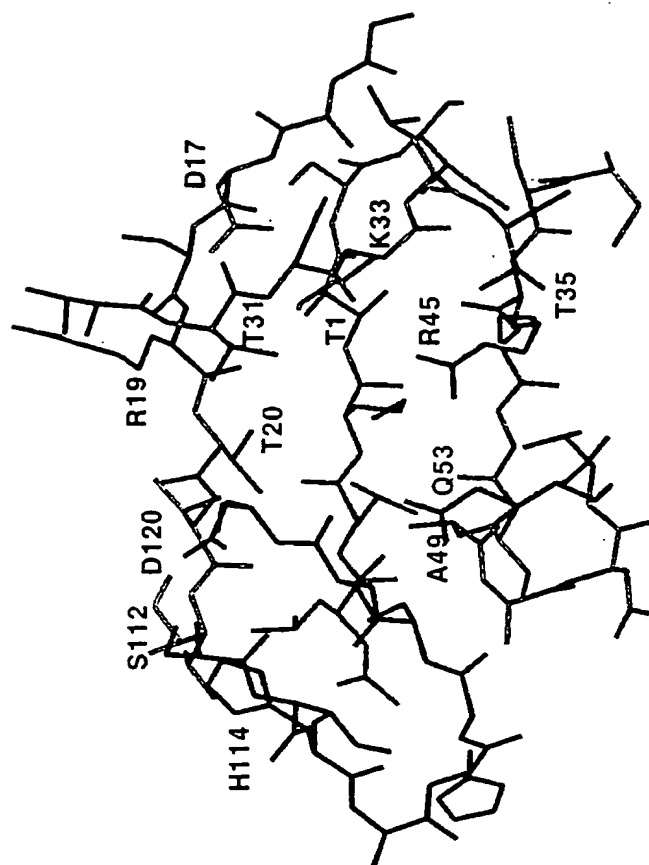


pre4 map2

Figur 4b



Figur 5



Figur 6a

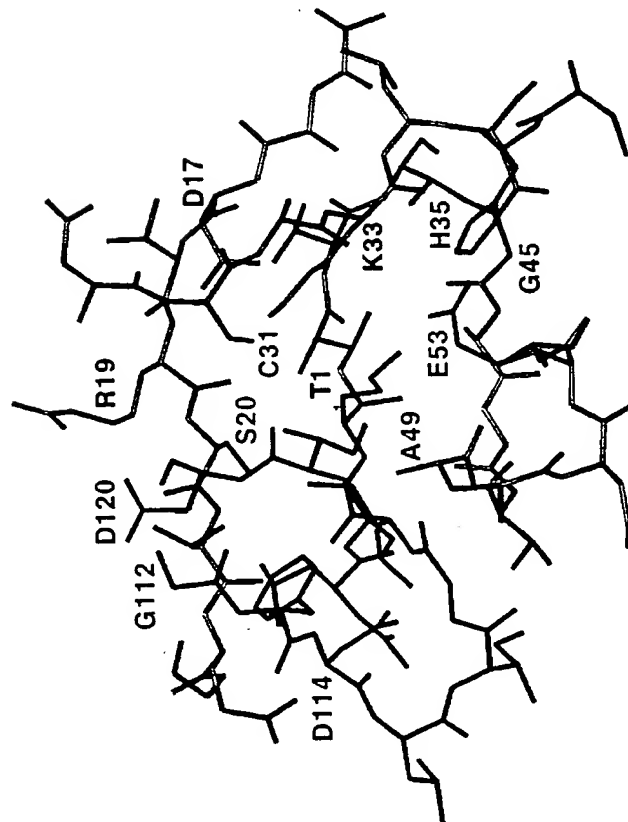
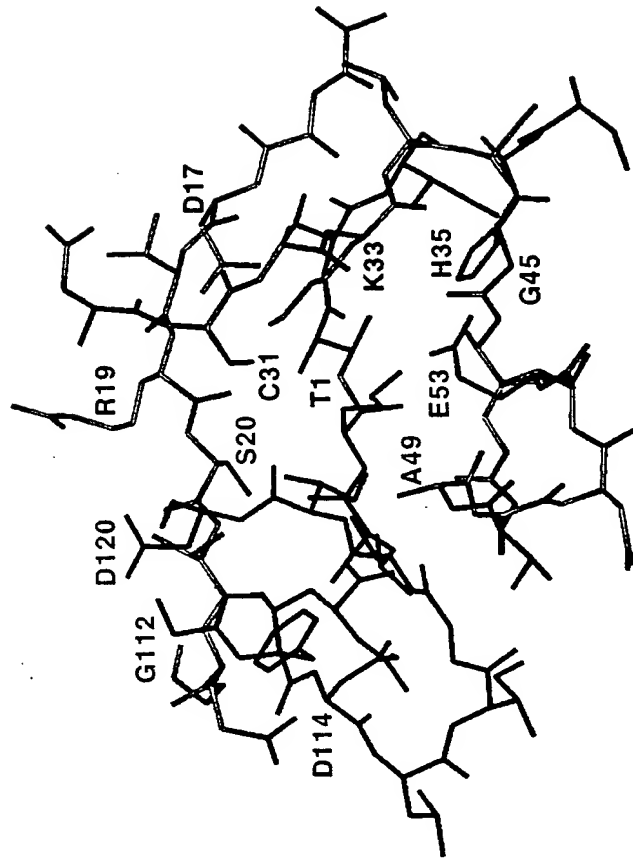
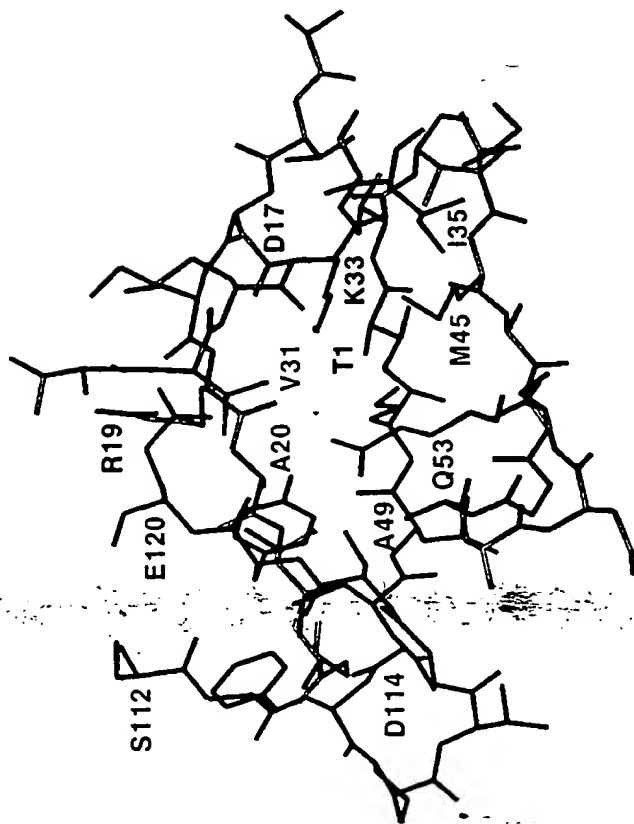
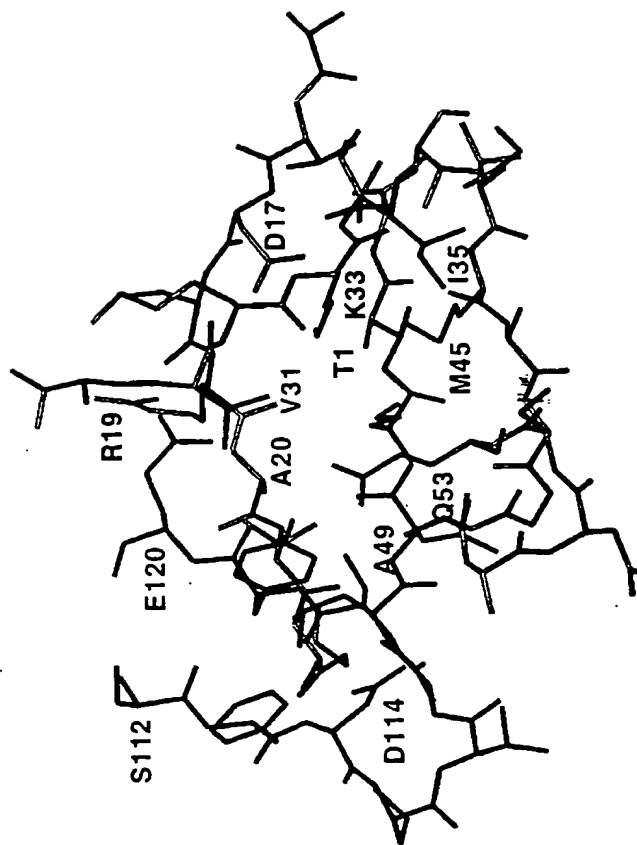
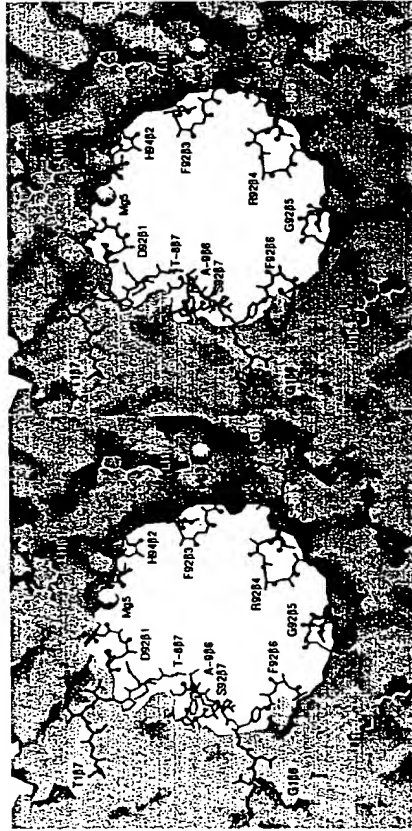


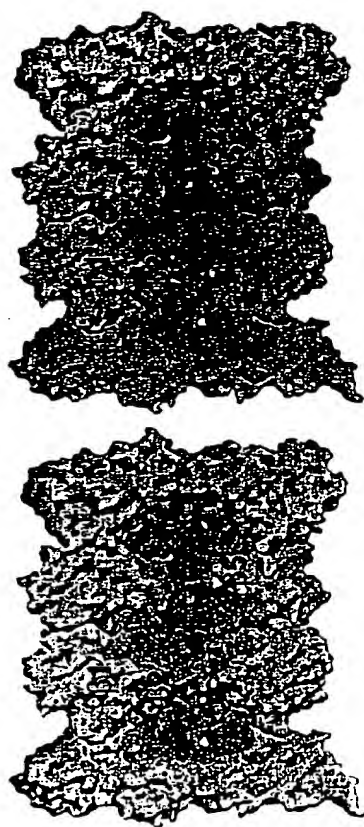
Figure 6b



Figur 6c



Figur 7



(
Figur 8

THIS PAGE BLANK (USPTO)